

学位論文題名

排卵期卵巣に対するインターロイキン-2  
ならびにインターロイキン-6の作用

—新しい卵巣灌流装置の作製と排卵数・ステロイドホルモン産生への影響—

学位論文内容の要旨

緒言

これまで、炎症に関わる物質や細胞が卵巣機能や排卵機構に重要な役割を果たしていることが報告されてきた。一方、微量で作用し、卵巣以外の細胞にも強い作用を持つ生理活性物質の排卵現象におよぼす作用を研究するために、生体内の様々な因子を除外し、かつ実際に排卵を観察できる優れた方法に *in vitro* 卵巣灌流法がある。

新しい灌流装置を作製し、さらにinterleukin(IL)-2と、IL-6の卵巣機能、特に排卵数、estradiol (E2) およびprogesterone (P4) 産生におよぼす影響を検討することを本研究の目的とした。

研究方法

1. 使用動物

幼若・雌・Sprague-Dawley rat (S-D rat)。

2. 研究方法

1) 卵巣灌流装置の作製：

従来の rat 卵巣灌流装置の問題点を検討し、独自に改良型の新しい灌流装置を作製した。

2) *in vitro* rat 卵巣灌流：

26～27日齢の S-D rat に妊娠ウマ血清ゴナドトロピン(PMSG)30IUを皮下注射し、48時間後に血管付 rat 右卵巣を摘出し、改良型装置にて38℃、45ml/hで灌流した。medium は M-199・Earle's 塩(gentamycin, insulin, heparin, amphotericin-B, BSA 含) 20mlを使用した。ヒツジ黄体形成ホルモン(LH) または LH+ILの添加直前と、添加後2時間おきに10時間までと22時間にサンプル (0.8ml) を採取し、E2, P4濃度を測定 (RIAチューブ固相法) した。灌流終了時に排卵された卵子を回収し、その数を排卵数とした。検討は、(1) control群 (mediumのみ)、(2) LH群 (LH100ng/ml)、(3) LH+IL-2,50群 (IL-2 50ng/ml)、(4)

LH+IL-2,100群 (IL-2 100ng/ml), (5) LH+IL-6,50群 (IL-6 50ng/ml), (6) LH+ IL-6,100群 (IL-6 100ng/ml) の6群で行った.

### 3) rat 卵巣顆粒膜細胞の培養 :

23日齢よりS-D ratにdiethylstilbestrol (DES) 1mg/day を4日間皮下注射し, 皮下注射終了の24時間後に顆粒膜細胞を採取した.  $1 \times 10^5$ 個/tubeの顆粒膜細胞を, McCoy's5A medium (L-glutamine, penicillin, streptomycin, androstenedione 含) 0.5ml/tube 中で48時間培養 (37°C, 95%air・5%CO<sub>2</sub>) した. ヒツジ卵胞刺激ホルモン (FSH) 50ng/ml 含有の有無別に, IL-2 (10, 30, 100 ng/ml) または IL-6 (0.3, 1.0, 3.0, 10 ng/ml) を添加し, 培養終了時の各E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>濃度をFSH単独添加 (control) 群の平均値を100として比較した.

### 4) 統計解析法 :

有意差検定には unpaired-t test, ANOVA +Dunnett's test を用いた.

## 研究成績

### 1. 新しいラット卵巣灌流装置 (改良型) の作製 :

従来の灌流装置は70~100mlの灌流液を必要とした. また灌流開始時に, 血管の破綻や空気塞栓を起こすことがあり, さらに実験毎に灌流量が異なっていた. そこで, 独自に新しい灌流装置を作製した. ガラス器具, チューブの内径等を縮小し, 装置全体の小型化に成功し, 20ml の medium で十分灌流可能となり, さらに, 装置を clean bench 内に設置しえた. 定量輸液ポンプを卵巣の直上に置き灌流中 終始一定の卵巣灌流量の維持を可能とした. 操作は簡便で灌流中の微調整は全く不要であった.

### 2. 卵巣灌流におけるステロイドホルモン産生 :

E<sub>2</sub>濃度はcontrol (n=6) 群では低値で推移した. しかし, LH群 (n=12) では, 6時間で  $21.6 \pm 4.3$  ng/ml (以下, mean $\pm$ SE) となり, 以後は22時間までほぼ同様の濃度であり, 0時間以外の全ての時点でLH群が有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった. P<sub>4</sub>濃度も2時間から22時間までLH群がcontrol群よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった. LH群, LH+IL-2,50群 (n=6), LH+ IL-2,100群 (n=6) におけるE<sub>2</sub>濃度, P<sub>4</sub>濃度の推移では, どの群間においてもE<sub>2</sub>濃度, P<sub>4</sub>濃度に統計学的に有意差を認めなかった. LH群, LH+IL-6,50群 (n=7), LH+IL-6,100群 (n=9) でのE<sub>2</sub>濃度の推移では, LH+IL-6,100群で2時間から10時間までそれぞれ  $5.8 \pm 2.1$ ,  $5.9 \pm 2.2$ ,  $6.1 \pm 2.1$ ,  $6.2 \pm 2.2$ ,  $6.0 \pm 2.1$  ng/ml となり, 4時間以降でLH群に比し有意 ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ) に低値となることが確認された. P<sub>4</sub>では, 3群間に有意差はなかった.

### 3. 卵巣灌流における排卵数 :

control群では, 1卵巣あたり  $0.5 \pm 0.5$  の排卵数であった. しかし, LH群では  $8.3 \pm 1.5$  の排卵が観察され, control群よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に多く排卵していた. LH+IL-2,50群では  $6.6 \pm 2.5$ , LH+IL-2,100群では  $2.2 \pm 1.1$  であり, LH+IL-6, 50群では  $5.9 \pm 1.1$ , LH+IL-6,100群では  $3.2 \pm 1.0$  の排卵が観察された. IL-2, IL-6ともに 100ng/ml の付加でLH群に比して有意 ( $p < 0.05$ ) に排卵数が抑制されることが確認された.

#### 4. ラット顆粒膜細胞培養におけるステロイドホルモン産生：

FSHを添加しない場合(全て,n=4)は E2産生, P4産生ともにごく微量であった. FSH単独添加(control)に対し, IL-6を付加すると(全て,n=4), E2産生は 87.9%(0.3ng/ml), 64.7%(1ng/ml), 24.6%(3ng/ml), 1.4%(10ng/ml)と濃度依存性にかつ1ng/ml以上の付加で有意( $p<0.01$  or  $p<0.001$ )に低下した. IL-2の付加では有意な変化を認めなかった. P4産生では, IL-6の3ng/ml, 10ng/mlの付加で control の 81.6%, 46.8%となり, 産生が抑制された. IL-2 では 10ng/ml, 30ng/ml の付加で control よりそれぞれ 36.9%, 51.6%の産生亢進が観察されたが, 100ng/mlでは増加は認められなかった. IL-2付加時のP4/E2比はどの付加濃度でも1.00前後であったが, IL-6では, その比は各付加濃度で 1.23, 1.72, 3.32, 34.0 と濃度依存性に上昇した.

### 考 察

rat卵巣灌流で近年主に用いられているBrännströmらの方法では, 実験ごとに灌流量が異なる等の欠点があった. 今回独自に作製した装置(改良型)では, 変動差のない一定の灌流量が得られ, また排卵数  $8.3\pm 1.5$  はその増減を比較・検討するには好都合で, 本装置は様々な排卵関連因子の研究に今後極めて有用と考えられる.

卵巣では卵胞閉鎖となる時, P4/E2比が高くなることが知られている. また卵胞閉鎖時には顆粒膜細胞の apoptosis が起きていることが報告され, さらに IL-6 が顆粒膜細胞の apoptosis を誘発することを示唆する成績もある. 本研究の卵巣灌流ならびに顆粒膜細胞培養実験の結果は, これらの研究成績と良く符合しており, IL-6 が顆粒膜細胞の apoptosis から卵胞閉鎖への誘導に関わっている可能性が示唆される.

IL-2については, 本研究からは排卵抑制の結果以外には何らの示唆も得られなかった. ただ仮定としては卵巣内のホルモン非産生細胞に作用する可能性や, 卵巣局在のリンパ球等に作用し, そこから産生される何らかの因子が排卵を抑制している可能性も想定できる.

今後は他のサイトカインについても, またそれらの作用機構についても検討したいと考える.

### 結 語

1. 灌流液量 20ml で灌流開始から終了まで一定の灌流量の維持が可能で, 良好な排卵数の得られる操作の簡便な in vitro ラット卵巣灌流装置(改良型)を作製しえた.

2. iv vitro ラット卵巣灌流において IL-2 は, LH による E2, P4 産生に影響しなかったが, IL-6 (100ng/ml添加) は LH による E2 産生を有意に抑制した.

3. iv vitro ラット卵巣灌流において IL-2 (100 ng/ml添加) または IL-6 (100ng/ml添加) により, LH による排卵数が有意に抑制されることが初めて示された.

4. ラット卵巣顆粒膜細胞培養において IL-6 は濃度依存性に E2, P4 産生を抑制した. 特に, E2 産生の抑制が著明であった.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 小 山 富 康

学 位 論 文 題 名

## 排卵期卵巣に対するインターロイキン-2 ならびにインターロイキン-6の作用

—新しい卵巣灌流装置の作製と排卵数・ステロイドホルモン産生への影響—

卵巣以外の細胞にも強い作用を持つ生理活性物質の排卵現象におよぼす作用を研究するために、生体内の様々な因子を除外し、かつ実際に排卵を観察できる優れた方法に *in vitro* 卵巣灌流法がある。新しい灌流装置を作製し、interleukin (IL)-2 と IL-6 の卵巣機能、特に排卵数、estradiol (E2) および progesterone (P4) 産生におよぼす影響を検討することを本研究の目的とした。

従来の rat 卵巣灌流装置の問題点を検討し、独自に改良型の新しい灌流装置を作製した。

26~27日齢の雌・Sprague-Dawley rat (S-D rat) に妊娠ウマ血清ゴナドトロピン (PMSG) 30IUを皮下注射し、48時間後に血管付 rat 右卵巣を摘出し、改良型装置にて38°C、45ml/hで灌流した。medium は M-199・Earle's 塩 (gentamycin, insulin, heparin, amphotericin-B, BSA 含) 20mlを使用した。ヒツジ黄体形成ホルモン (LH) または LH+IL の添加直前と、添加後2時間おきに10時間までと22時間にサンプル(0.8ml)を採取し、E2, P4濃度を測定 (RIA チューブ固相法) した。灌流終了時に排卵された卵子を回収し、その数を排卵数とした。検討は、(1) control 群 (medium のみ)、(2) LH 群 (LH 100 ng/ml)、(3) LH+IL-2, 50群 (IL-2 50 ng/ml)、(4) LH+IL-2, 100群 (IL-2 100 ng/ml)、(5) LH+IL-6, 50群 (IL-6 50 ng/ml) (6) LH+IL-6, 100群 (IL-6 100 ng/ml) の6群で行った。

23日齢よりS-D rat に diethylstilbestrol 1mg/day を4日間皮下注射し、皮下注射終了の24時間後に顆粒膜細胞を採取した。1×10<sup>5</sup>個/tube の顆粒膜細胞を、McCoy's 5 A medium (L-glutamine, penicillin, streptomycin, androstendione 含) 0.5ml/tube 中で48時間培養 (37°C, 95% air・5% CO<sub>2</sub>) した。ヒツジ卵巣刺激ホルモン (FSH) 50ng/ml 含有の有無別に、IL-2 (10, 30, 100 ng/ml) または IL-6 (0.3, 1.0, 3.0, 10 ng/ml) を添加し、培養終了時の E2, P4 濃度を FSH 単独添加 (control) 群の平均値を100として比較した。

### 1. 新しいラット卵巣灌流装置 (改良型) の作製:

従来の灌流装置は70~100ml の灌流液を必要とした。また灌流開始時に、血管の破綻や空気塞栓を起こすことがあり、さらに実験毎に灌流量が異なっていた。そこで、独自に新しい灌流装置を作製した。ガラス器具、チューブの内径等を縮小し、装置全体の小型化に成功し、20ml の medium で十分灌流可能となり、さらに、装置を clean bench 内に設置しえた。定量輸液ポンプを卵巣の直上に置き灌流中 終始一定の卵巣灌流量の維持を可能とした。操作は簡便で灌流中の微調整は全く不要であった。

## 2. 卵巣灌流におけるステロイドホルモン産生:

E2濃度はcontrol (n=6) 群では低値で推移した。しかし、LH群 (n=12) では、6 時間で  $21.6 \pm 4.3$  ng/ml (以下, mean $\pm$ SE) となり、以後は22時間までほぼ同様の濃度であり、0 時間以外の全ての時点でLH群が有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった。P 4 咽の2 時間から22時間までLH 群がcontrol 群よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった。LH 群, LH+IL-2, 50群 (n=6), LH+IL-2, 100群 (n=6) におけるE 2 濃度, P 4 濃度の推移では、どの群間においてもE 2 濃度, P 4 濃度に統計学的に有意差を認めなかった。LH 群, LH+IL-6, 50群 (n=7), LH+IL-6, 100群 (n=9) でのE 2 濃度の推移では、LH+IL-6, 100群で2 時間から10時間までそれぞれ  $5.8 \pm 2.1$ ,  $5.9 \pm 2.2$ ,  $6.1 \pm 2.1$ ,  $6.2 \pm 2.2$ ,  $6.0 \pm 2.1$  ng/ml となり、4 時間以降でLH群に比し有意 ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ) に低値となることが確認された。P 4 では、3 群間に有意差はなかった。

## 3. 卵巣灌流における排卵数:

control 群では、1 卵巣あたり  $0.5 \pm 0.5$  の排卵数であった。しかし、LH群では  $8.3 \pm 1.5$  の排卵が観察され、control 群よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に多く排卵していた。LH+IL-2, 50群では  $6.6 \pm 2.5$ , LH+IL-2, 100群では  $2.2 \pm 1.1$  であり、LH+IL-6, 50群では  $5.9 \pm 1.1$ , LH+IL-6, 100群では  $3.2 \pm 1.0$  の排卵が観察された。IL-2, IL-6ともに100ng/mlの付加でLH群に比して有意 ( $p < 0.05$ ) に排卵数が抑制されることが確認された。

## 4. ラット顆粒膜細胞培養におけるステロイドホルモン産生:

FSH を添加しない場合 (全て, n=4) はE2産生, P4産生ともごく微量であった。FSH 単独添加 (control) に対し、IL-6を付加すると (全て, n=4), E2産生は  $87.9\%$  ( $0.3$  ng/ml),  $64.7\%$  ( $1$  ng/ml),  $24.6\%$  ( $3$  ng/ml),  $1.4\%$  ( $10$  ng/ml) と濃度依存性にかつ  $1$  ng/ml以上の付加で有意 ( $p < 0.01$  or  $p < 0.01$ ) に低下した。IL-2の付加では有意な変化を認めなかった。P4産生では、IL-6の  $3$  ng/ml,  $10$  ng/ml の付加で control の  $81.6\%$ ,  $46.8\%$  となり、産生が抑制された。IL-2では  $10$  ng/ml,  $30$  ng/ml の付加で control よりそれぞれ  $36.9\%$ ,  $51.6\%$  の産生亢進が観察されたが、 $100$  ng/mlでは増加は認められなかった。IL-2付加時のP4/E2比はどの付加濃度でも1.00前後であったが、IL-6では、その比は各付加濃度で  $1.23$ ,  $1.72$ ,  $3.32$ ,  $34.0$  と濃度依存性に上昇した。

以上の研究成果を要約すると次のごとくになる。

1. 灌流液量 20ml で灌流開始から終了まで一定の灌流量の維持が可能で、良好な排卵数の得られる操作の簡便な *in vitro* ラット卵巣灌流装置 (改良型) を作製しえた。
2. *in vitro* ラット卵巣灌流において IL-2は、LHによるE2, P4産生に影響しなかったが、IL-6 (100ng/ml 添加) はLHによるE2産生を有意に抑制した。
3. *in vitro* ラット卵巣灌流において IL-2 (100ng/ml 添加) またはIL-6 (100ng/ml 添加) により、LHによる排卵数が有意に抑制されることが初めて示された。
4. ラット卵巣顆粒膜細胞培養において IL-6は濃度依存性にE2, P4産生を抑制した。特に、E2産生の抑制が著明であった。

発表に際し、石橋輝雄教授から灌流中のLHの作用時間と生体内でのLHサージとの相違、灌流液のLH添加前のestradiol 濃度、本装置で観察可能な排卵の回数について、さらに灌流実験でLH, 培養実験でFSH を用いた理由などについて質問があった。小山富康教授からは、灌流液中のestradiol とprogesterone濃度が時間経過で異なることの理由とIL-2とIL-6の排卵抑制機構の相違について、また皆川知紀教授からは排卵を促進するサイトカインについての質問があった。申請者はこれらの質問に対し概ね妥当な解答をしえたと判断された。

発表後、石橋教授ならびに小山教授の面接審査を受け、両教授より合格の判定を下された。

以上、本研究は、独自に改良した卵巣灌流法と顆粒膜細胞培養法を用いてIL-2とIL-6の排卵とステロイド産生に対する影響をはじめて明確にしえた基礎的検討であり、博士 (医学) の授与に価すると判断された。